



UNIVERSIDAD DE CASTILLA LA MANCHA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN RECURSOS CINEGÉTICOS

MÁSTER UNIVERSITARIO EN INVESTIGACIÓN BÁSICA Y APLICADA EN
RECURSOS CINEGÉTICOS

TRABAJO FIN DE MASTER

**“Efecto de diferentes concentraciones de los
antioxidantes melatonina, crocina y trolox
sobre la calidad seminal a la descongelación
en Ciervo Ibérico”**

Directores:

Dr. José Julián Garde López Brea

Dra. Ana Josefa Soler Valls

Línea de Investigación: Bancos de recursos genéticos

María Iniesta Cuerda

Albacete a 6 de julio 2012

ÍNDICE

RESUMEN

1. Introducción.
2. Material y métodos.
 - 2.1 Reactivos.
 - 2.2 Obtención de las muestras espermáticas.
 - 2.3 Congelación del material espermático.
 - 2.4 Diseño experimental.
 - 2.5 Evaluación seminal.
 - 2.5.1 Estudio de la motilidad.
 - 2.5.2 Estudio de la motilidad.
 - 2.5.3 Estudio de parámetros cinéticos del espermatozoide.
 - 2.5.4 Estado del acrosoma
 - 2.5.5 Análisis de citometría.
 - 2.6 Análisis estadístico.
3. Resultados.
4. Discusión.
5. Conclusiones.

BIBLIOGRAFÍA



RESUMEN

El objetivo del trabajo que a continuación se expone fue estudiar el efecto de la adición en el diluyente de congelación de tres antioxidantes (crocina, melatonina y trolox) a distintas concentraciones, sobre la calidad seminal de espermatozoides de ciervo Ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*) descongelados. El material espermático con el que se trabajó procedió de 26 machos de ciervo ibérico abatidos durante la época de celo (septiembre-octubre) y fue recogido postmortem de la cola del epidídimo. El diluyente de congelación utilizado fue un TRIS-citrato-fructosa adicionado en 2 fracciones. La fracción A se formuló con un 20% de yema de huevo y la fracción B fue realizada igual que la fracción A más un 6% de glicerol. Al diluyente de congelación se le adicionaron los siguientes antioxidantes a las concentraciones finales indicadas obteniéndose 7 tratamientos: crocina (0,5 mM, 0,75 mM, y 1 mM), Melatonina (1 mM, 2,5 mM y 5 mM) y Trolox 1 mM. Además, también se utilizó el diluyente sin antioxidantes como un control.

La calidad seminal fue estudiada tras la descongelación y después de dos horas de incubación a 37° C mediante evaluación con microscopía de fases y con citometría de flujo valorándose los siguientes parámetros: motilidad individual, calidad de movimiento y porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto mediante microscopía de contraste de fases, parámetros descriptores del movimiento evaluados mediante sistemas de imágenes computerizados (CASA), y viabilidad, potencial de la membrana mitocondrial e integridad del ADN mediante citometría de flujo.

A la descongelación no se encontraron diferencias significativas para los parámetros de movilidad y de integridad acrosomal. Sin embargo, cuando se evaluó la calidad seminal mediante citometría de flujo se observó que la melatonina añadida a concentraciones de 2,5 y 5 mM al diluyente de congelación produce una disminución en la viabilidad y actividad mitocondrial en comparación con el control y con el antioxidante crocina suplementado en el diluyente de congelación a una concentración 0,75 mM. Además, la utilización



de crocina en todas sus concentraciones en el diluyente de congelación permitió disminuir el porcentaje de espermatozoides apoptóticos en relación al control.

Por otra parte, cuando se realizó la evaluación seminal tras 2 horas de incubación de las muestras espermáticas a 37 °C se observó, que la velocidad curvilínea (VCL) y el desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) fueron menores para las muestras espermáticas congeladas en un diluyente con 5 mM de melatonina. De nuevo, el antioxidante crocina fue el mejor para disminuir el porcentaje de espermatozoides apoptóticos.

En conclusión la crocina es un buen antioxidante para mejorar la calidad seminal a la descongelación de espermatozoides epididimarios de ciervo Ibérico.

Palabras clave: congelación espermática, crocina, melatonina, trolox, epidídimo



1. Introducción.

Las técnicas de reproducción asistida (TRA), en los últimos años, han adquirido especial relevancia tanto en humanos como en el ámbito animal, destacando en el campo de la producción animal y en el campo de la creación de bancos de gemoplasma. La aplicación más ampliamente difundida en el campo de la creación de bancos de gemoplasma, ha sido la obtención y congelación de material espermático (Holt *et al.*, 1996) La crioconservación de espermatozoides procedentes del epididimo es factible pudiendo ser utilizados para la creación de bancos de gemoplasma en especies silvestres de ciervo (Garde *et al.* 2006; Martínez Pastor *et al.*, 2006).

El desarrollo de las TRA aplicadas en cérvidos en los últimos 35 años, ha sido muy grande debido a la rápida expansión de las granjas de ciervos alrededor del mundo (Asher *et al.*, 2000), destacando la Inseminación Artificial (IA), la transferencia de embriones con ovulación múltiple (MOET) y la producción *in vitro* de embriones (IVP). Un interés notable adquieren también estas prácticas cuando se orientan al manejo de las poblaciones de ciervo ibérico, pues las TRA juegan un papel importante en la conservación genética y la mejora de éstas generación tras generación (Fernández-Santos *et al.*, 2006), especialmente en poblaciones sometidas a ambientes transformados dentro de fincas de caza cercadas en las que éstas sufren aislamiento genético (Martínez *et al.*, 2002). A pesar del desarrollo de estas técnicas, se ha de conseguir la optimización de los protocolos que ellas requieren para asegurar el éxito una vez aplicadas.

La mayoría de los trabajos referentes a éstas técnicas, han sido desarrollados partiendo de espermatozoides de muestras eyaculadas. Los espermatozoides eyaculados están inmersos en plasma seminal el cual, además de proporcionar nutrientes para los gametos ofrece cantidad de sustancias antioxidantes que lo protegen frente al estrés oxidativo (O *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2003). Sin embargo, las muestras espermáticas epididimarias, al ser obtenidas desde la cola del epidídimo, no han entrado en contacto con el plasma seminal, convirtiéndose ésta en una de las grandes diferencias entre muestras espermáticas eyaculadas y epididimarias. Este hecho hace que las muestras epididimarias puedan ser más susceptibles a los



procesos biotecnológicos a los que se someten ya que la mayoría de ellos generan especies reactivas de oxígeno. Por lo tanto, se hace necesario perfeccionar los protocolos de congelación espermática para muestras epididimarias a partir de los protocolos existentes desarrollados para muestras eyaculadas. De este modo la mejora de los protocolos de congelación de espermatozoides epididimarios de ciervo, objeto de este trabajo, resulta imprescindible.

El empleo de antioxidantes parece ser una de las formas más útiles para mejorar la congelabilidad de este tipo de muestras. Dentro de los protocolos de congelación, los procesos de enfriamiento, congelación y descongelación generan estrés físico y químico en las membranas de los espermatozoides, disminuyendo la viabilidad y la capacidad fertilizante de éstos, debido, entre otras causas, a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), consecuencia del proceso de congelación y descongelación principalmente (Chatterjee *et al.*, 2001). La gran concentración de ácidos grasos poliinsaturados en la membrana plasmática de los espermatozoides los hace altamente vulnerables al ataque de los ROS (O *et al.*, 2006). Cuando los niveles de ROS superan al de los antioxidantes se produce el estrés oxidativo (Fernández-Santos *et al.*, 2007). Los daños que desencadenan en los espermatozoides van desde alteraciones del ADN (Lopes *et al.* 1998), variaciones en su citoesqueleto (Hinshaw *et al.*, 1986), inhibición de su capacidad de fusión con el oocito (Aitken *et al.*, 1989) hasta efectos sobre el axonema espermático que se traducen en pérdida de motilidad (De Lamirade *et al.*, 1992).

En el presente estudio se evaluaron tres antioxidantes con diferentes propiedades químicas los cuales fueron seleccionados debido a que son muy diferentes en sus mecanismos de acción, en las preferencias de radicales a los que se unen y en la acumulación en los orgánulos (Domínguez-Rebolledo *et al.*, 2010). Entre los diferentes antioxidantes que pueden ser utilizados se encuentra la melatonina, la crocina y el trolox. La melatonina es producida por la glándula pineal, y se trata de un efectivo antioxidante que tiene actividad tanto en fase lipofílica como hidrofílica (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2001). Evita la oxidación ya que regula el aumento de enzimas antioxidantes y la disminución



de enzimas pro-oxidantes y radicales libres. Además, los metabolitos resultantes de la interacción entre la melatonina con distintos radicales, tienen también efecto antioxidante (Leon *et al.*, 2004; Hardeland, 2005). Distintos estudios realizados en humanos con muestras espermáticas frescas (Shang *et al.*, 2004), en moruecos con semen congelado (Succu *et al.*, 2011) y en verracos con semen refrigerado (Jang *et al.*, 2009) han demostrado que la melatonina protege a los espermatozoides contra el estrés oxidativo.

La crocina, un glucosyl éster de la crocina, es uno de los carotenoides que proporciona el color amarillo al azafrán. (*Crocus sativus*) (Carmona *et al.*, 2005). La crocina, se ha demostrado, que previene de la apoptosis en distintos tipos celulares (Ochiai *et al.* 2007). Además, Heidary *et al.* (2008) demostraron que la administración oral de 50 mg de azafrán suponía una mejora en la morfología y la motilidad de los espermatozoides en hombres fértiles, estas evidencias promueven el testaje de este antioxidante en otras especies, como es el ciervo ibérico, de ahí la singularidad de este estudio, pues es la primera vez que se utiliza la crocina suplementando al diluyente de congelación.

El trolox es un análogo de la vitamina E soluble en agua. La adición de trolox al medio hace que mejore la longevidad y la calidad de espermatozoides refrigerados y congelados de verraco (Peña *et al.*, 2005). Un estudio anterior en el que se evaluó la capacidad protectora del trolox con muestras procedentes de epidídimos de ciervo ibérico, demostró que este antioxidante era capaz de disminuir la cantidad de ROS y la lipoperoxidación tanto en muestras en las que se había inducido estrés oxidativo como en las que no, además el trolox, en muestras oxidadas, resultó un protector para daño acrosomal y para daños al ADN (Domínguez-Rebolledo A.E. *et al.*, 2010).

Con todo esto, el principal objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la adición de melatonina, crocina y trolox a diferentes concentraciones sobre la calidad seminal del semen descongelado en ciervo ibérico. Para ello, se evaluaron parámetros subjetivos como la motilidad y la calidad de movimiento con microscopía de fases, la cinética de los espermatozoides mediante un sistema de análisis espermático computerizado, (CASA) y la integridad del acrosoma con microscopía de fases. Además, se evaluaron diversos parámetros mediante citometría de flujo, como la viabilidad y la presencia de



espermatozoides apoptóticos, la actividad de la mitocondria y la integridad en el ADN.

2. Material y métodos.

2.1 Reactivos.

Los fluorocromos fueron adquiridos de Invitrogen y Sigma Chemical Co (Madrid, España). El naranja de Acridina procedía de Polysciences Inc. ((Warrington, PA, USA) y. El equipamiento citométrico, el software y los insumos para su funcionamiento, procedían de Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA).

2.2 Obtención de las muestras espermáticas.

Para este estudio se utilizaron espermatozoides recogidos de la cola del epidídimo de 26 machos adultos de ciervo ibérico. Los machos fueron abatidos en su hábitat natural durante la época de celo (Septiembre-October) en actividades cinegéticas reguladas por la Ley 2/93 de Castilla-La Mancha, la cual está bajo las Regulaciones de la Unión Europea.

Los testículos fueron transportados al laboratorio, a una temperatura de unos 22° C, dentro de las 2 horas seguidas tras la muerte del animal. Para la obtención del material espermático, los testículos fueron liberados de las envolturas testiculares y se realizaron diversos cortes en la cola del epidídimo, recogiendo el material espermático con una hoja de bisturí según describió Soler *et al.* (2003) tras lo cual se depositó en una placa de petri con la fracción A del diluyente de congelación.

2.3 Congelación del material espermático.

El material espermático de cada epidídimo fue recogido y diluido con la fracción A del diluyente de congelación TRIS-citrato fructos (TCF) con un 20% de yema de huevo clarificada. Tras ello, se incorporó el mismo volumen de fracción A más semen que de fracción B del diluyente, la cual tuvo la misma composición que la fracción A, pero con un 12% de glicerol. Además, a la fracción B se le añadieron los antioxidantes para obtener los siguientes diluyentes con las concentraciones finales que se detallan a continuación: crocina (0,5 mM, 0,75 mM y 1 mM), melatonina (1 mM, 2,5 mM y 5 mM) y trolox



(1 mM). Las muestras espermáticas fueron diluidas con el diluyente de congelación para obtener una concentración final de 200×10^6 espermatozoides por ml.

2.4 Diseño experimental.

Para llevar a cabo los experimentos realizados en este trabajo se llevo a cabo el siguiente diseño experimental:

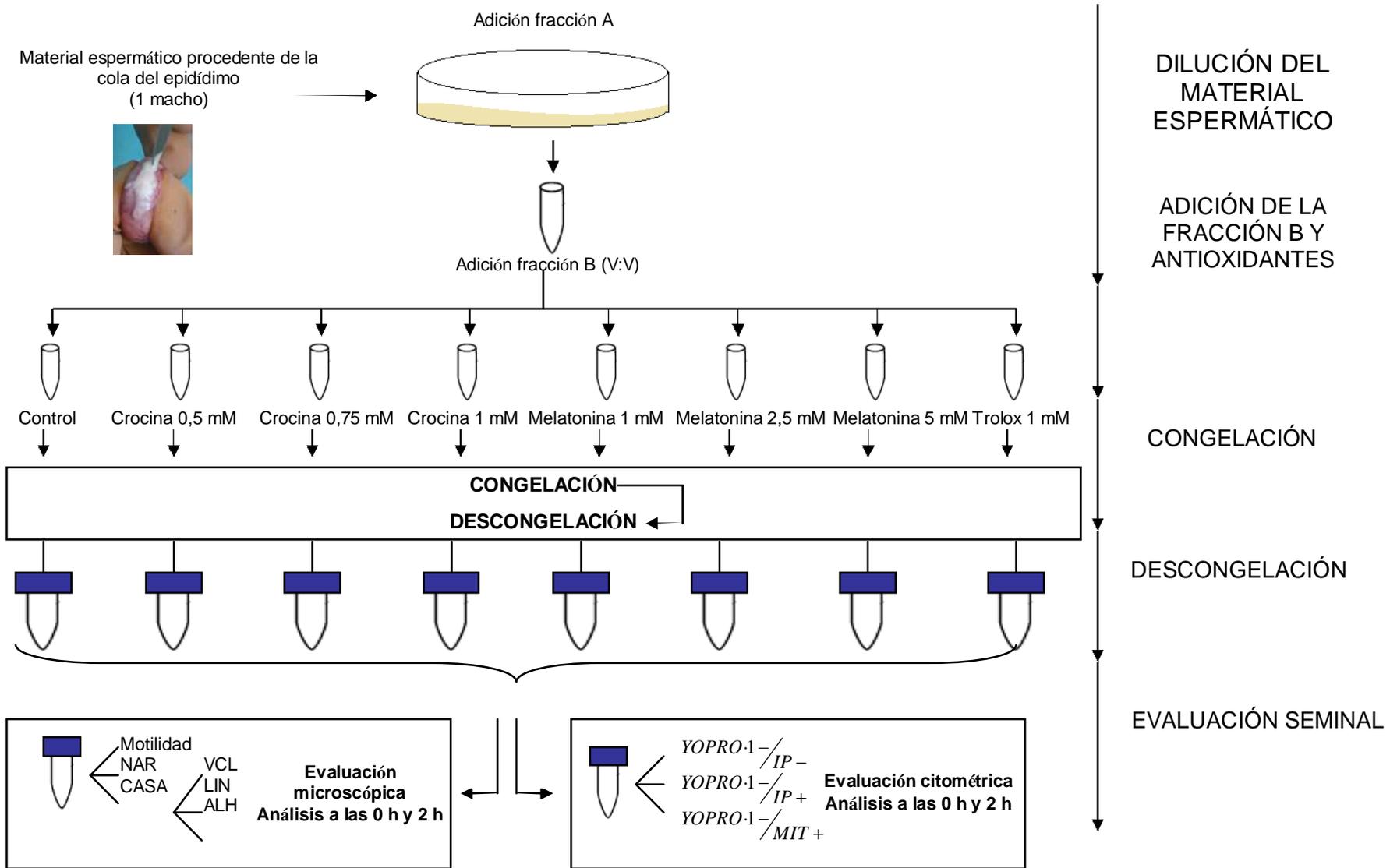


Figura 1. Esquema del diseño del experimento.

María Iniesta Cuerva



2.5 Evaluación seminal.

La descongelación se llevó a cabo a 37° C durante 30 segundos. Se descongeló una pajuela por macho y por tratamiento. Posteriormente el contenido de las pajuelas para cada tratamiento fueron vertidos en tubos de 15 ml colocando los 8 tubos en el baño a 37 °C durante un periodo de 5 minutos. Tras ello, se evaluaron los parámetros espermáticos mencionados abajo. Posteriormente, las muestras se incubaron a 37 °C durante 2 horas tras lo cual se llevó a cabo la misma evaluación excepto la determinación de la integridad del ADN que solamente se realizó sobre las muestras descongeladas.

2.5.1 Estudio de la motilidad.

Se evaluó el porcentaje de espermatozoides móviles de forma subjetiva. Para ello, se depositaron sobre una cámara de Mackler previamente atemperada a 37° C 5 μ l de muestra espermática. La observación se llevó a cabo con un microscopio de contraste de fases con platina calefactable a 100x aumentos (Nikon Eclipse 80i; Nikon; Tokyo, Japón).

2.5.2 Estudio de la calidad del movimiento.

Sobre esta misma muestra se determinó de forma subjetiva el tipo de movimiento de los espermatozoides mediante la siguiente clasificación (0: inmóviles, 1: espermatozoides giran sobre sí mismos, 2: espermatozoides con movimientos circulares, 3: movimientos rectilíneos lentos, 4: movimientos rectilíneos rápidos, 5: movimientos rectilíneos muy rápidos).

2.5.3 Estudio de parámetros cinéticos del espermatozoide.

Los diferentes parámetros cinéticos se evaluaron mediante un sistema de análisis espermático computerizado (*Sperm-Class Analyzer*, (SCA ®), Microptic; Barcelona, España). Las grabaciones fueron realizadas con un microscopio trinocular con platina calefactable (Nikon Eclipse 80i; Nikon, Tokyo, Japón) y cámara digital (*A302fs DC*; Basler Vision Technologies; Ahrensburg, Germany). Todo ello conectado a un ordenador con el software *SCA® 2002* (Microptic, Barcelona, España).

La evaluación se realizó depositando 5 μl de muestra espermática en una cámara de Makler previamente atemperada a 37° C y un objetivo de contraste de fase negativo 10x. Para cada espermatozoide fueron evaluados los siguientes parámetros (Figura 2): velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m}/\text{seg}$), la linealidad (LIN , %), y el desplazamiento lateral de la cabeza (ALH , μm).

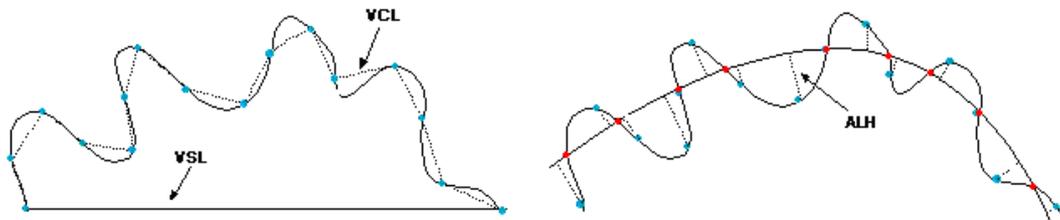


Figura 2. Descripción de los parámetros analizados.

2.5.4 Estado del acrosoma

La integridad del acrosoma del espermatozoide se evaluó diluyendo 5 μl de la muestra de material espermático en 50 μl de una solución fijadora de glutaraldehído al 2 % en un tampón de cacodilato de sodio/HCl 0,165 M (pH 7,3). La evaluación de los acrosomas se realizó mediante un microscopio de contraste de fases (Nikon Eclipse 80i; Nikon, Tokyo, Japón) a 400x aumentos. Para cada muestra se tuvieron en cuenta un total de 100 espermatozoides. Solamente aquellos espermatozoides con el borde apical íntegro y sin ningún tipo de anomalía fueron considerados como células con el acrosoma normal.

2.5.5 Análisis de citometría.

Algunas de las características fisiológicas de los espermatozoides fueron evaluadas mediante citometría de flujo. El procedimiento se realizó de acuerdo a trabajos anteriores de otros autores (Domínguez-Rebolledo *et al.*, 2009; Martínez-Pastor *et al.*, 2009; Domínguez-Rebolledo *et al.*, 2010). Las muestras espermáticas fueron diluidas hasta los 10^6 espermatozoides por mililitro en medio BGM-3 y teñido con tres combinaciones diferentes de fluoróforos. Las mediciones se realizaron mediante un citómetro de flujo *Cytomics FC 500* (Becton Dickinson, San José, California) equipado con un láser de argón de 488-nm (YO-PRO-1, PI, CM-H₂DCFDA y SCSA) y otro de helio de 633-nm (para el Mitotracker Deep Red). La fluorescencia del YO-PRO-1 y SCSA fue



leída usando un filtro 525/25BP. Mientras, en el caso del PI y el Mitotracker Deep Red se emplearon filtros 615DSP y 675/40BP respectivamente. Para cada muestra, fueron grabadas aproximadamente unas 10.000 células. El análisis de los datos de citometría fue llevado a cabo usando el software *WEASEL* v.2.6 (WEHI; Melbourne, Victoria, Australia). Se evaluaron los siguientes parámetros espermáticos:

- La *viabilidad* espermática (estado del plasmalema) fue evaluada con YO-PRO-1 (0.1 μ M) y Yoduro de Propidio (PI) (10 μ M). El YO-PRO-1 permite discriminar aquellos espermatozoides con un aumento en la permeabilidad de la membrana y el PI marca aquellas células espermáticas con la membrana dañada. Los espermatozoides fueron incubados en oscuridad a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se identificaron tres subpoblaciones diferentes: espermatozoides viables (YO-PRO-1-/PI-), espermatozoides apoptóticos (YO-PRO-1+/PI-) y espermatozoides muertos (YO-PRO-1+/PI +); dos de las cuales fueron tenidas en cuenta en este trabajo: espermatozoides viables (YO-PRO-1-/PI-) y espermatozoides apoptóticos (YO-PRO-1+/PI-).

- La actividad *mitocondrial* fue evaluada con una combinación de YO-PRO-1 (0,1 μ M) y Mitotracker Deep Red (0,1 μ M). En este caso mediante el uso del Mitotracker se identificaron las mitocondrias activas, mientras que con el YO-PRO-1 se discriminó los espermatozoides con la membrana íntegra de los que presentaron un aumento de la permeabilidad (Martínez Pastor *et al.* 2010). Al igual que en el caso anterior, los espermatozoides fueron incubados en presencia de los fluorocromos en oscuridad durante 20 minutos.

- El estado del ADN se evaluó mediante el *sperm chromatin stability assessment* (SCSA,). Para ello se utilizó el colorante metacromático naranja de Acridina, que se intercala con las hebras de la cromatina, dando fluorescencia verde en las zonas con ADN intacto y rojo en las zonas con ADN dañado como describió Evenson *et al.* (2002). Las muestras (5 μ l) fueron diluidas en medio TNE (500 μ l), congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a -80° C hasta su evaluación. En el momento de la evaluación las muestras fueron descongeladas a 37° C en un baño María. Posteriormente se añadieron 400 μ l de solución detergente y treinta segundos después se incorporó el colorante Naranja de Acridina (1,2 ml) (Evenson *et al.*, 2002). La lectura se realizó a los



dos minutos y medio. El parámetro utilizado en este trabajo, fue el índice de fragmentación del ADN (% DFI_{total}). Este índice de fragmentación informa sobre la cantidad de emisión roja que produce una muestra del total de fluorescencia emitida.

2.6 Análisis estadístico.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software *SPSS 2.15.0* para *Windows* (*SYSTAT Software Inc.*, Evanston, IL, USA). Se realizó un *GLM-Anova* para evaluar el efecto de los diferentes antioxidantes sobre la calidad seminal de las muestras espermáticas tras la descongelación y tras 2 horas de incubación a 37° C. Los datos fueron expresados como media \pm error. La comparación de medias entre los tratamientos fue realizada usando el test de *Bonferroni*. Se consideró la existencia de diferencias significativas en aquellos casos en los que $p \leq 0,05$.

3. Resultados.

Los efectos producidos por la adición de los tratamientos antioxidantes al diluyente de congelación sobre la calidad seminal a la descongelación muestran distintas respuestas en los parámetros analizados.

Los resultados de motilidad, de integridad acrosomal y los parámetros de caracterización del movimiento obtenidos tras la descongelación y a las 2 horas de incubación a 37° C se muestran en la Tabla 1. A la descongelación no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los distintos tratamientos antioxidantes. Sin embargo, tras el periodo de incubación se encontraron diferencias en los parámetros de VCL y ALH entre tratamientos, presentando el valor más bajo para estos parámetros las muestras espermáticas congeladas con un diluyente con 5 mM de melatonina en relación al control (Tabla 1).

En relación a las evaluaciones llevadas a cabo con el citómetro de flujo, se encontraron diferencias significativas entre tratamientos a la descongelación para diversos parámetros. Así, las muestras espermáticas congeladas con 5 mM de la melatonina presentaron una viabilidad menor ($p \leq 0,05$) en relación al control. No existieron diferencias ($p > 0,05$) entre el resto de tratamientos antioxidantes y el control en relación a este parámetro (Tabla 2). Por otra parte, la crocina incluida en el diluyente de congelación a diferentes concentraciones



fue capaz de disminuir el porcentaje de espermatozoides apoptóticos en relación al control ($p \leq 0,05$) (Tabla 2). En relación a la actividad mitocondrial, las muestras espermáticas congeladas con un diluyente con 2,5 mM de melatonina presentaron un valor menor ($p \leq 0,05$) en relación a los diluyentes suplementados con 0,75 mM y 1 mM de crocina, no encontrándose diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre estos tratamientos antioxidantes y el resto (Tabla 2). Tras un periodo de incubación de 2 horas a 37 °C se siguió observando que las muestras congeladas con crocina a diferentes concentraciones fueron las únicas capaces de disminuir ($p \leq 0,05$) el porcentaje de espermatozoides apoptóticos en relación con el control.



Tabla 1. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de antioxidantes al diluyente de congelación sobre la calidad seminal a la descongelación en muestras espermáticas epididimarias de ciervo Ibérico

Evaluación espermática	Diluyentes de congelación							
	Control	Crocina _{0,5}	Crocina _{0,75}	Crocina ₁	Melatonina ₁	Melatonina _{2,5}	Melatonina ₅	Trolox ₁
Después de la descongelación (0h)								
Motilidad individual (%)	57,5±3,2	62,4±3,3	62,9±3,2	62,9±3,2	55,9±3,3	51,9±3,2	53,4±3,3	58,1±3,2
Integridad acrosoma	56,0±3,5	57,9±3,6	57,3±3,5	58,8±3,5	56,2±3,6	53,5±3,5	53,9±3,6	56,8±3,5
VCL (µm/s)	96,4±3,7	104,5±3,8	103,6±3,7	106,0±3,7	95,7±3,8	93,6±3,7	94,4±3,8	97,8±3,7
LIN (%)	32,6±1,1	33,8±1,1	33,9±1,1	33,3±1,1	35,0±1,1	33,9±1,1	35,6±1,1	33,2±1,1
ALH (µm)	3,9±0,2	4,1±0,2	4,0±0,2	4,1±0,2	3,6±0,2	3,6±0,2	3,5±0,2	3,8±0,2
Después de la incubación (2h)								
Motilidad individual (%)	44,2±4,2	45,7±4,3	50,0±4,2	48,3±4,2	38,0±4,3	37,0±4,2	34,8±4,4	43,3±4,2
Integridad acrosoma	38,6±2,7	38,8±2,8	36,9±2,7	38,9±2,7	41,0±2,8	36,8±2,7	36,0±2,8	41,4±2,7
VCL (µm/s)	85,0±3,7 ^a	80,6±3,8 ^{ab}	83,8±3,7 ^{ab}	78,3±3,7 ^{ab}	74,7±3,8 ^{ab}	70,2±3,7 ^{ab}	67,3±3,9 ^b	73,9±3,7 ^{ab}
LIN (%)	31,0±1,1	29,7±1,1	31,4±1,1	31,1±1,1	33,3±1,1	32,3±1,1	31,9±1,1	31,1±1,1
ALH (µm)	3,4±0,1 ^a	3,2±0,1 ^{ab}	3,3±0,1 ^a	3,1±0,1 ^{abc}	2,8±0,1 ^{abc}	2,7±0,1 ^{bc}	2,6±0,1 ^c	2,9±0,1 ^{abc}

Los datos están expresados como media ± error típico (n=26)

Los valores de cada parámetro que presenten diferentes letras indican diferencias significativas (p≤0,05)



Tabla 2. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de antioxidantes al diluyente de congelación sobre la calidad seminal a la descongelación evaluada mediante citometría de flujo en muestras espermáticas epididimarias de ciervo Ibérico.

Evaluación espermática	Diluyentes de congelación							
	Control	Crocina _{0,5}	Crocina _{0,75}	Crocina ₁	Melatonina ₁	Melatonina _{2,5}	Melatonina ₅	Trolox ₁
Después de la descongelación (0h)								
$YOPRO \cdot 1 - / IP_-$ (%)	58,2±3,6 ^a	50,2±3,7 ^{ab}	52,1±3,6 ^a	48,9±3,6 ^{ab}	43,7±3,7 ^{ab}	39,2±3,6 ^{ab}	34,1±3,8 ^b	46,9±3,6 ^{ab}
$YOPRO \cdot 1 - / IP_+$ (%)	17,3±1,5 ^b	13,9±1,6 ^a	13,9±1,5 ^a	13,9±1,5 ^a	19,2±1,6 ^{ab}	14,8±1,5 ^{ab}	16,1±1,6 ^{ab}	21,1±1,5 ^b
$YOPRO \cdot 1 - / MIT_+$ (%)	30,5±2,8 ^{ab}	34,2±2,9 ^{ab}	37,2±2,8 ^a	37,6±2,8 ^a	27,1±2,9 ^{ab}	24,6±2,8 ^b	26,0±3,0 ^{ab}	30,9±2,8 ^{ab}
Después de la incubación (2h)								
$YOPRO \cdot 1 - / IP_-$ (%)	39,1±2,8	39,2±2,8	38,9±2,8	37,8±2,8	33,5±2,8	29,8±2,8	27,5±2,9	36,1±2,8
$YOPRO \cdot 1 - / IP_+$ (%)	12,8±0,9 ^a	7,8±0,9 ^{bc}	7,3±0,9 ^{bc}	6,7±0,9 ^c	11,3±0,9 ^{ab}	9,5±0,9 ^{abc}	9,3±1,0 ^{abc}	12,0±0,9 ^a
$YOPRO \cdot 1 - / MIT_+$ (%)	29,7±2,8	31,0±2,9	34,6±2,8	32,8±2,8	27,4±2,9	23,9±2,8	23,7±2,9	28,4±2,8

Los datos están expresados como media ± error típico (n=26)

Los valores de cada parámetro que presenten diferentes superíndices indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

$YOPRO \cdot 1 - / IP_-$: espermatozoides viables

$YOPRO \cdot 1 - / IP_+$: espermatozoides apoptóticos

$YOPRO \cdot 1 - / MIT_+$: espermatozoides con mitocondria activa.

La integridad del ADN no se vio casi afectada por el proceso de congelación presentando bajos valores de % DFI todos los tratamientos estudiados no existiendo diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los diluyentes de congelación utilizados (Gráfico 1)

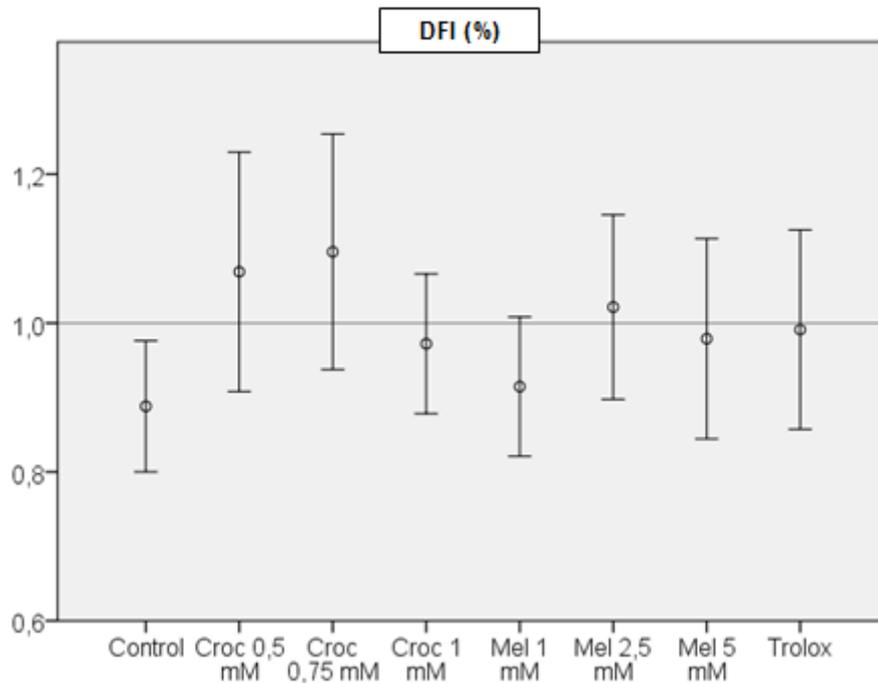


Gráfico 1. Efecto de la adición de antioxidantes sobre daños en el ADN de espermatozoides ciervo evaluados mediante citometría.



4. Discusión.

En este trabajo se evaluó el efecto de la adición de diferentes antioxidantes, melatonina, crocina y trolox a distintas concentraciones sobre la calidad seminal de muestras espermáticas epididimarias de ciervo Ibérico a la descongelación. Estos antioxidantes han sido utilizados previamente en esta especie por Domínguez-Rebolledo *et al.*, 2010. Sin embargo, en aquel estudio los antioxidantes fueron adicionados una vez descongeladas las muestras espermáticas. Por lo tanto, esta es la primera vez que se valora si la melatonina, la crocina y el trolox protegen a los espermatozoides epididimarios de ciervo Ibérico frente al procedimiento de congelación.

Son conocidos los efectos negativos producidos por los procesos de enfriamiento y congelación sobre la calidad espermática (Watson, 2000; Fernández-Santos *et al.*, 2007; Domínguez-Rebolledo *et al.*, 2009), siendo la principal consecuencia de éstos la inducción de estrés oxidativo (Aisen *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta que en este trabajo las muestras con las que se trabajó fueron muestras epididimarias en las que los espermatozoides se encuentran desprovistos del plasma seminal, este efecto dañino se podría acrecentar, pues éstos podrían ser más susceptibles al estrés oxidativo por estar exentos de la protección que el plasma seminal les atribuye (Chen *et al.*, 2002; O *et al.*, 2006). De este modo, es posible que, la adición de antioxidantes al diluyente de congelación ejerza un efecto protector sobre los espermatozoides durante el desarrollo de estos procesos, lo que se vería reflejado tras la descongelación, en un mejor valor de los parámetros de calidad seminal.

Como se observa en este trabajo, los parámetros de motilidad no se vieron influenciados por la presencia de antioxidantes en el medio de congelación tras la descongelación. Sin embargo, si se observó un efecto negativo en las muestras tratadas con melatonina a una concentración de 5 mM tras un periodo de incubación a 37 °C durante 2 horas. Así pues, las muestras espermáticas congeladas con este diluyente tuvieron unos valores de VCL y ALH menores que los del control. Estos resultados no coinciden con los obtenidos por Dominguez-Rebolledo *et al.* (2010) los que demostraron un aumento del ALH respecto del control en las muestras tratadas con melatonina



5 mM. Esto podría ser debido a que los efectos de la melatonina dependen en gran medida de las condiciones experimentales y del tipo de muestra.

En relación a los resultados de motilidad obtenidos en este trabajo para la crocina los resultados son diferentes a aquellos obtenidos por Domínguez-Rebolledo *et al.* (2010). Así, estos autores encontraron que cuando se añadía a las muestras descongeladas 1 mM de crocina se provocaba un importante estímulo de la motilidad. Estas diferencias con nuestro trabajo pudieron ser debidas al hecho de que la adición del antioxidante se realizó al diluyente de congelación, el cual, debido al proceso de congelación-descongelación, hubiera sufrido un desequilibrio redox u otro cambio en su composición lo que pudo provocar, y en relación a lo que Domínguez-Rebolledo *et al.* (2010) especularon, un bloqueo de su capacidad para favorecer el metabolismo celular, no produciéndose así el aumento de la motilidad consecuente de ese posible incremento de la tasa metabólica.

En cuanto a los resultados de integridad del acrosoma que hemos obtenido, la adición de antioxidantes no mejoró significativamente el porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro. Conocida es la importancia del mantenimiento del buen estado del acrosoma, pues es esta zona la que va a permitir la unión del espermatozoide a la zona pelúcida del ovocito (Wassarman, 1988). Nuestros resultados no coinciden con los de otro estudio en los que se demuestra que la adición de sustancias antioxidantes, en concreto la superóxido dismutasa (SOD), a los medios de congelación provoca mejores resultados en el porcentaje de acrosomas íntegros que los controles en especies como el muflón europeo (*Ovis orientalis musimon*) (Berlinguer *et al.*, 2003). Esto pudo ser debido a que en el estudio de Berlinguer *et al.* se utilizaron muestras eyaculadas de muflón mientras que nuestras muestras procedían del epidídimo. El contacto de los espermatozoides con el plasma seminal incluye la eliminación o alteración de macromoléculas integradas en la membrana plasmática (Austin, 1985). Es posible que estos cambios, que se localizan particularmente sobre la zona del acrosoma, hagan más probable la fusión de las membranas plasmática y acrosómica saliendo el contenido del orgánulo, de modo que la mejora del porcentaje de espermatozoides con acrosomas intactos respecto del control obtenida por Berlinguer *et al.* podría



haber sido debida a que la SOD tiene un efecto ralentizador de este proceso de fusión de membranas. Para nuestro caso, el hecho de no haber entrado en contacto con el plasma seminal hace que estos cambios en la membrana no se hayan producido de manera que los antioxidantes no ejercen ningún efecto a este nivel, no obteniéndose variaciones en los resultados entre tratamientos y control.

En lo que a parámetros espermáticos evaluados mediante citometría de flujo en este estudio se refiere, el antioxidante crocina fue eficaz para disminuir el porcentaje de espermatozoides apoptóticos, tanto tras la descongelación como después de la incubación, obteniendo tras ésta un descenso de estas poblaciones respecto del control. La concentración 0,75 mM también presentó un descenso de esta población respecto al tratamiento con trolox. Estos datos coinciden con los obtenidos por Domínguez-Rebolledo *et al.* (2010) los cuales demostraron que la crocina es un antioxidante que mantiene la estabilidad de las membranas plasmáticas. Además, los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los que consiguieron Ochiai *et al.*, 2007 en el que se demostró que la crocina previene de la apoptosis en distintos tipos celulares.

En nuestro trabajo la concentración 5 mM de melatonina fue la más perjudicial para las muestras espermáticas congeladas con este diluyente. Estos resultados no coinciden con Domínguez-Rebolledo *et al.* (2010), en los que los diluyentes suplementados con melatonina no presentaron variaciones en las poblaciones de espermatozoides vivos y apoptóticos respecto del control y con el resto de tratamientos. Sin embargo, si hay concordancia con lo obtenido por Succu *et al.* 2011 y por Casao *et al.* (2010), quienes demostraron que la congelación de semen de ovino con diluyente suplementado con melatonina en el estudio realizado por los primeros, y su adición a semen fresco de ovino a los segundos, afectaba a la viabilidad de los espermatozoides a la descongelación y tras incubación, respectivamente, aumentando las poblaciones de apoptóticos en detrimento de la población de espermatozoides viables. Todo lo anterior vuelve a recordarnos, la diversidad de respuesta de la melatonina en función de las condiciones experimentales.

Los efectos de la suplementación con trolox 1 mM se encuentran a caballo entre los tratamientos de crocina y melatonina, en lo que a viabilidad se refiere,

pero de igual manera, su adición resultó negativa pues la viabilidad obtenida con este tratamiento fue menor que la que se obtuvo con el control. Estos resultados son comparables a los obtenidos por Fernández-Santos *et al.* (2007), los cuales mostraban un descenso de la viabilidad en las muestras tratadas con vitamina E respecto al control. Este descenso en la viabilidad a la descongelación puede ser debido, como ya aventuraron Cao y Culter en 1993, a que la vitamina E actúe más como un estimulador de la oxidación más que como un antioxidante, lo que viene apoyado por otros estudios en los que se distinguieron efectos negativos de la suplementación con vitamina E en parámetros de calidad seminal, como son descensos de la motilidad en semen de humanos (Donnelly *et al.*, 1997) y en semen de morueco (Upreti *et al.*, 1997).

En cuanto al estado de las mitocondrias ninguno de los tratamientos presentaron diferencias significativas con el control, pero si se observó que los diluyentes con crocina a 0,75 mM y 1 mM son más beneficiosos para el estado de las mitocondrias que el uso de melatonina 2,5 mM. Nuestros resultados no son similares a los obtenidos por Leon *et al.* (2005) lo cuales demostraron que la melatonina ejercía una acción protectora en la mitocondria. Tampoco lo son a los obtenidos por Domínguez-Rebolledo *et al.* (2010), en los que se observaba una toxicidad para la mitocondria en los tratamientos con crocina. Estas diferencias con Domínguez-Rebolledo *et al.* podrían ser debidas a que los momentos de adición del antioxidante son diferentes, de modo que el hecho de incorporar la crocina tras la descongelación pudo desencadenar patrones de comportamiento en el metabolismo de los espermatozoides diferentes lo que hace que los resultados no sean comparables.

Los resultados de las muestras diluidas con suplementación con trolox no son similares a los obtenidos por Fernández-Santos *et al.* (2007), en los que, se observó un efecto nocivo de este antioxidante tanto a la concentración de 3,2 y 6,4 mM, con respecto al control para la actividad mitocondrial tanto a la descongelación como después de la incubación, mientras que en nuestro caso, únicamente se observó un ligero descenso de la actividad tras la incubación. Esto pudo ser acarreado por las diferencias en las concentraciones entre ambos estudios, correlacionándose la cantidad de antioxidante con el efecto



generado, de manera que en nuestro caso, al ser una concentración baja, comparada con la del otro estudio, no se manifestó el verdadero efecto del antioxidante y sí lo hubiera hecho en el estudio de Fernández-Santos *et al.* (2007). De ahí que la disminución obtenida tras la incubación en nuestro estudio hubiera podido ser consecuencia del tiempo que ésta se postergo.

Por último en los resultados del análisis del ADN, no se han encontrado diferencias en el estado del ADN entre los diferentes diluyentes adicionados con antioxidantes. Nuestros resultados están en consonancia con el obtenido por Baumber *et al.* (2005), el cual demostró que la adición de antioxidantes no mejoraba el estado del ADN en semen de caballo. Sin embargo, los resultados del tratamiento de melatonina a 1 mM, dejan ver una discreta disminución del daño en el ADN, lo que vendría a coincidir con lo que en otros trabajos anteriores se había observado. En particular, Domínguez-Rebolledo *et al.* (2010) con el tratamiento de Melatonina 1 mM, obtuvieron una reducción mínima, así como en otras especies, concretamente en la ovina, con la que Succu *et al.* (2011) consiguieron evidencias de que la adición de melatonina, de nuevo a una concentración de 1 mM, durante la crioconservación de semen de morueco mitigó el daño en éste. No obstante, en rasgos generales, los resultados obtenidos muestran que el daño en el ADN tras la congelación fue mínimo para los diferentes tratamientos. Una de las razones que se plantean para explicar este hecho podría ser la alta compactación que presenta la cromatina en esta especie.



5. Conclusiones.

1. La adición de melatonina a una concentración de 5 mM al diluyente de congelación disminuye a la descongelación los parámetros de VCL, ALH y la viabilidad en espermatozoides epididimarios en relación a un tratamiento sin antioxidante
2. La adición de 2,5 mM de melatonina al diluyente de congelación disminuye a la descongelación el porcentaje de espermatozoides epididimarios con mitocondrias activas en relación al tratamiento sin antioxidante.
3. La adición de crocina a las concentraciones 0,5, 0,75 y 1 mM disminuye el porcentaje de espermatozoides apoptóticos en relación con el diluyente adicionado con trolox y con el diluyente sin antioxidante.
4. El antioxidante Trolox adicionado a una concentración de 1 mM en el diluyente de congelación no mejoró la calidad seminal a la descongelación de las muestras espermáticas epididimarias de ciervo Ibérico.



BIBLIOGRAFÍA

- Acuña-Castroviejo D., Martín M., Macías M., Escames G., León J., Khaldy H., Reiter R. J. (2001). Melatonin, mitochondria and cellular bioenergetics. *J. Pineal Res.* 30:65–74.
- Aisen E., Quintana M., Medina V., Morello H. y Venturino A. (2005). Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology.* 50:239–249.
- Aitken R.J., Clarkson J.S., Fishel S. (1989). Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod.* 41:183–197.
- Asher G., Berg D., Evans G., Salamon S., Maxwell W. (2000). Storage of semen and artificial insemination in deer. *Anim Reprod Sci.* 62:195–211.
- Austin C.R. (1985). *Biology of Fertilization* (CB Metz, A. Monroy, eds.) Academic Press, New York, vol. 2, pp. 122-155. LIBRO
- Baumber J., Ball B.A. y Linfor J.J. (2005). Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. *Am J Vet Res.* 66:772–779.
- Berlinguer F., Ledda S., Rosati I., Bogliolo L., Leoni G., Naitana S. (2003). Superoxide dismutase affects the viability of thawed European mouflon (*Ovis g. musimon*) semen and the heterologous fertilization using both IVF and intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Fertil Dev.* 15:19–25.
- Carmona M., Zalacain A., Pardo J. E., López E., Alvarruiz A., Alonso G. L. (2005). Influence of different drying and ageing conditions on saffron constituents. *J. Agric. Food Chem.* 53:3974–3979.
- Casao A., Mendoza N., Pérez-Pé R., Abecia J.A., Forcada F., Cebrian-Pérez J.A. y Muino-Blanco T. (2009). Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate. *J Pineal Res.* 48:39-46.



- Chatterjee S., Gagnon C. (2001). Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol Reprod Dev.* 59:451–458.
- Chen H., Cheung M.P., Chow P.H., Cheung A.L., Liu W., WS O. (2002). Protection of sperm DNA against oxidative stress in vivo by accessory sex gland secretions in male hamsters. *Reproduction.* 124:491–499.
- Chen H., Chow P. H., Cheng S. K., Cheung A. L. M., Cheng L.Y. L., and O W. S. (2003). Male genital tract antioxidant enzymes: their source, function in the female, and ability to preserve sperm DNA integrity in the golden hamster. *J. Androl.* 24:704–711.
- De Lamirade D.E., Gagnon C. (1992). Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J Androl.* 13:368–378.
- Dominguez-Rebolledo A.E., Fernandez-Santos M.R., Bisbal A., Ros-Santaella J.L., Ramon M., Carmona M., Martinez-Pastor F, Garde JJ. (2010). Improving the effect of incubation and oxidative stress on thawed spermatozoa from red deer by using different antioxidant treatments. *Reprod Fertil Dev.* 22: 856-870.
- Dominguez-Rebolledo A.E., Fernandez-Santos M.R., Garcia-Alvarez O., Maroto-Morales A., Garde J.J., Martinez-Pastor F. (2009). Washing increases the susceptibility to exogenous oxidative stress in red deer spermatozoa. *Theriogenology.* 72:1073-1084.
- Donnelly E.T., McClure N. y Lewis S.E. (1999). The effect of ascorbate and alpha-tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. *Mutagenesis.* 14:505–512.
- Evenson D.P., Larson K.L., Jost L.K. (2002). Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl.* 23:25–43.
- Fernández-Santos M. R., Martínez-Pastor F., García-Macías V., Estes M. C., Soler A. J., Paz P., Anel L., Garde J. J. (2007). Sperm characteristics and DNA integrity of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*)



- epididymal spermatozoa frozen in the presence of enzymatic and nonenzymatic antioxidants. *J. Androl.* 28:294–305.
- Garde J. J., Martínez-Pastor F., Gomendio M., Malo A. F., Soler A. J., Fernández-Santos M. R., Esteso M. C., García A. J., Anel L., Roldán E. R. S. (2006). The application of reproductive technologies to natural populations of red deer. *Reprod. Domest. Anim.* 41(Suppl. 2):93–102.
 - Hardeland R. (2005). Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine.* 27:119–130.
 - Heidary M., Vahhabi S., Reza Nejadi J., Delfan B., Birjandi M., Kaviani H. y Givrad, S. (2008). Effect of saffron on semen parameters of infertile men. *Urol. J.* 5, 255–259
 - Hinshaw D.B., Sklar L.A., Bohl B., Schraufstatter I.U., Hyslop P.A., Rossi M.W., Spragg R.G., Cochrane C.G. (1986). Cytoskeletal and morphologic impact of cellular oxidant injury. *Am J Pathol.* 123:454–464.
 - Holt W.V., Abaigar T., Jabbour H.N. (1996). Oestrous synchronization, semen preservation and artificial insemination in the Mohor gazelle (*Gazella dama mhorr*) for the establishment of a genome resource bank programme. *Reprod Fertil Dev.* 8: 1215-1222.
 - Jang, H., Kim, Y., Kim, B., Park, I., Cheong, H., Kim, J., Park, C., Kong, H., Lee, H., Yang, B. (2009). Ameliorative effects of melatonin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on boar sperm characteristics and subsequent in vitro embryo development. *Reprod. Domest. Anim.*, **in press.**
 - Leon J., Acuna-Castroviejo D., Escames G. *et al.* (2005). Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J Pineal Res.* 38:1-9.
 - Leon J., Acuna-Castroviejo D., Sainz R. M., Mayo J. C., Tan D. X., Reiter R. J. (2004). Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci.* 75:765–790.
 - Lopes S., Jurisicova A., Sun J.G., Casper R.F. (1998). Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 13:896–900.



- María R. Fernández-Santos, Milagros C. Esteso, Vidal Montoro, Ana J. Soler, José J. Garde. (2006). Influence of Various Permeating Cryoprotectants on Freezability of Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*) Epididymal Spermatozoa: Effects of Concentration and Temperature of Addition. *Journal of Andrology*. 27:734-746
- Martínez J.M., Carranza J., Fernández-García J.L., Sánchez-Prieto C.B. (2002). Genetic variation of red deer populations under hunting exploitation in southwestern Spain. *J Wildl Manag*. 66: 1273–1282.
- Martínez Pastor F., Mata-Campuzano M., Álvarez Rodríguez M., Álvarez M., Anel L. y de la Paz P. (2010). Probes and Techniques for Sperm Evaluation by Flow Cytometry. *Reprod. Domest. Anim. Suppl*. 2:67-78
- Martínez-Pastor F., Aisen E., Fernández-Santos M.R., Esteso M.C., Maroto-Morales A., García-Alvarez O., Garde J.J. (2009). Reactive oxygen species generators affect quality parameters and apoptosis markers differently in red deer spermatozoa. *Reproduction*. 137: 225-235.
- Martínez-Pastor F., Fernández-Santos M. R., del Olmo E., Domínguez-Rebolledo A. E., Esteso M. C., Montoro V., Garde J. J. (2008). Mitochondrial activity and forward scatter vary in necrotic, apoptotic and membrane-intact spermatozoan subpopulations. *Reprod. Fertil. Dev*. 20:547–556.
- Martínez-Pastor F., Martínez F., García-Macias V., Esteso M., Anel E., Fernández-Santos M., Soler A., de Paz P., Garde J., Anel L. (2006). A pilot study on post-thawing quality of Iberian red deer spermatozoa (epididymal and electroejaculated) depending on glycerol concentration and extender osmolality. *Theriogenology*. 66:1165–1172.
- O WS, Chen H, Chow PH. (2006). Male genital tract antioxidant enzymestheir ability to preserve sperm DNA integrity. *Mol Cell Endocrinol*. 250:80–83.
- Ochiai T., Shimeno H., Mishima K. I., Iwasaki K., Fujiwara M., Tanaka H., Shoyama Y., Toda A., Eyanagi R., Soeda S. (2007). Protective effects of carotenoids from saffron on neuronal injury in vitro and in vivo. *Biochim. Biophys. Acta*. 1770:578–584.



- Peña F. J., Saravia F., Johannisson A., Walgren M., Rodríguez- Martínez H. (2005). A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen–thawed boar spermatozoa. *Int. J. Androl.* 28:07–114.
- Shang, X., Huang, Y., Ye, Z., Yu, X., Gu, W. (2004). Protection of melatonin against damage of sperm mitochondrial function induced by reactive oxygen species. *Zhonghua Nan Ke Xue* 10:604–607.
- Succu S., Berlinguer F., Pasciu V., Satta V., Leoni G.G., Naitana S. (2011). Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner *J. Pineal Res.* 1:9
- Upreti G.C., Jensen K., Oliver J.E., Duganzich D.M., Munday R., Smith J.F. (1997). Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically defined diluent containing antioxidants. *Anim Reprod Sci.* 48: 269–278.
- Wassarman P.M. (1988). Zona pellucida glycoproteins. *Annu Rev Biochem.* 57:415–442.
- Watson P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci.* 60-61: 481-492